# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



#### INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07D 277/04, A61K 31/425, C07D

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/61431

295/18, 417/12

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

2. Dezember 1999 (02.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/03712

A1

(22) Internationales Anmeldedatum:

28. Mai 1999 (28.05.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 23 831.2

28. Mai 1998 (28.05.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRO-BIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMIT-TELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, D-06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). GLUND, Konrad [DE/DE]; Aralienstrasse 10, D-06122 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Hegelstrasse 12, D-06114 Halle (DE). KRUBER, Susanne [DE/DE]; Reilstrasse 9, D-06114 Halle (DE).
- (74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar, G. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

- (54) Title: NEW DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV EFFECTORS
- (54) Bezeichnung: NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

#### (57) Abstract

The invention relates to dipeptide compounds or compounds analogous to dipeptide compounds, which are made of an amino acid and a thiazolidine or pyrrolidine group, and to their salts. The invention further relates to the use of these compounds in the treatment of impaired glucose tolerance, glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidoses, diabetes mellitus, diabetic neuropathy and nephropathy as well as secondary diseases of diabetes mellitus in mammals.

#### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Моласо	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	TE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	TL.	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten vo
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	- Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

PCT/EP99/03712

Die vorliegende Erfindung betrifft Dipeptidverbindungen bzw. zu Dipeptidverbindungen analoge Verbindungen, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze, im weiteren Dipeptidverbindungen genannt, und die Verwendung der Verbindungen zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Die Erfindung betrifft also auch ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration von Säugern mit Hilfe von Dipeptidverbindungen als aktivitätsmindernde Effektoren (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen.

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-2 (GIP, ) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1, ), also Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch Incretine genannt), sind Substrate der DP IV, da diese von den

2

N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin in vitro und in vivo abspalten kann.

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate in vivo kann dazu dienen,
unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen wie auch
bei pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu
unterdrücken. Z.B. basiert Diabetes mellitus Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw.
Störungen in der Rezeptorfunktion, die u.a. in proteolytisch
bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet
sind.

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch Diabetes mellitus) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, wie auch modernere Verfahren, zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche i.v. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen.

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pan-

3

kreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems.

Die Verwendung von Alanyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid als Inhibitoren von DP IV bzw. von zu DP IV analoger Enzymaktivität ist bereits aus der PCT/DE 97/00820 und die Verwendung von Isoleucyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid-Hydrochlorid bereits aus der DD 296 075 bekannt. Bei dem in diesem Stand der Technik eingesetzten Isoleucyl-Thiazolidid handelt es sich um natürliches, also L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid: Zum Prioritätsdatum und noch am Anmeldetag der beiden Druckschriften stand nur diese, die natürliche Form von Isoleucyl-Thiazolidid zur Verfügung.

Es ist festgestellt worden, daß diese Verbindungen, insbesondere L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, gute Effektoren für DP IV und DP IV analoge Enzymaktivitäten sind. Bei der Verwendung dieser Verbindung können bei einigen Patienten bzw. Krankheitsformen jedoch gewisse Probleme auftreten:

Je nach Symptomen und Schwere z.B. von Diabetes mellitus, wäre es z.B. wünschenswert, Effektoren zur Verfügung zu haben, die eine andere Wirkung als die bekannten Verbindungen aufweisen: So ist bekannt, daß Diabetes-mellitus-Patienten individuell "eingestellt" werden müssen, um eine optimale Behandlung ihrer Krankheit zu ermöglichen. So sollte bei einigen Fällen z.B. eine verringerte Aktivität von DP IV Effektoren ausreichen. Auch könnte eine zu hohe Inhibitor Aktivität und die permanen-

4

te Verabreichung desselben Medikaments insbesondere wegen der lebenslangen Dauer der Behandlung unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Weiter könnte es auch wünschenwert sein, gewisse Transporteigenschaften zur Erhöhung der Resorptionsgeschwindigkeit der Effektoren in vivo zu verbessern.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue (insbesondere aktivitätsmindernde) Effektoren zur Behandlung von z.B. beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern und ein einfaches Verfahren zur Behandlung dieser Krankheiten bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Dipeptidverbindungen bzw. Analoga von Dipeptiden, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet werden, und deren Salze gelöst.

Bei der - vorzugsweise oralen - Verabreichung dieser Effektoren an einen Säugerorganismus werden die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP<sub>1-42</sub> und GLP-1<sub>7-36</sub> (o.a. GLP-1<sub>7-37</sub> oder deren Analoga) durch DP IV-oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert. Der Erfindung liegt also der Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukosestimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) führt, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-anloger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann;

- 2. die erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat;
- 3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in einer nachfolgenden Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

Insbesondere sind dazu erfindungsgemäß Dipeptidverbindungen geeignet, bei denen die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure, wie z.B. Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin oder Asparaginsäure, ausgewählt wird.

Die möglichst orale Applikation der erfindungsgemäßen hochaffinen, niedermolekularen Enzyminhibitoren ist eine kostengünstigere Alternative z.B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearance-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden.

Wie vorstehend erwähnt, kann es z.B. bei der Dauerbehandlung von Diabetes mellitus erforderlich sein, Effektoren mit einer definierten Aktivität zur Verfügung zu stellen, mit denen in-

6

dividuelle Bedürfnisse von Patienten erfüllt bzw. Symptome behandelt werden können. Die erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen weisen daher bei einer Konzentration (der Dipeptidverbindungen) von 10 µM, insbesondere bei den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen, eine Aktivitätsminderung von Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10, bevorzugt von mindestens 40 % auf. Häufig ist auch eine Aktivitätsminderung von mindestens 60 % bzw. mindestens 70 % erforderlich. Bevorzugte Effektoren können auch eine Aktivitätsminderung von maximal 20 % bzw. 30 % aufweisen. Weiterhin sind die Transporteigenschaften der vorliegenden Verbindungen, insbesondere durch den Peptidtransporter Pep T1 deutlich verbessert.

Besonders bevorzugte Dipeptidverbindungen sind L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid und seine Salze. Diese Verbindungen weisen im Verhältnis zu L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid bei in etwa gleichgroßer Wirkung bezüglich der Glukosemodulation überraschenderweise einen ca. fünffach besseren Transport durch den Peptidtransporter Pep T1 auf.

Weitere bevorzugte Verbindungen werden in Tabelle 1 angegeben.

Die Salze der erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen können z.B. organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sein. Besonders bevorzugt werden die Fumarate, die eine hervorragende Wirkung bei einer überraschend hohen Stabilität gegenüber Hydrolyse aufweisen und wesentlich weniger löslich sind als die Hydrochloride. Diese Eigenschaften sind auch bei der Galenik von Vorteil.

7

Ferner werden L-threo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, und L-allo Isoleucyl Pyrrolidid und seine Salze, insbesondere die Fumarsalze, bevorzugt.

Die Salze der Dipeptidverbindungen können in einem molaren Verhältnis von Dipeptid(analogon)komponente zu Salzkomponente von 1 : 1 oder 2 : 1 vorliegen. Ein derartiges Salz ist z.B. (Ile-Thia), Fumarsäure.

Besonders bevorzugte Salze sind die Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid und L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.

Die Erfindung betrifft somit Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität und deren Verwendung zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Effektoren der DP IVbzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen wie z.B. beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge mindestens eines erfindungsgemäßen Effektors der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, also Medikamente, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung oder deren Salze gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können z.B. als parenterale oder enterale Formulierungen vorliegen und entsprechende Träger enthalten bzw. sie können als orale Formulierungen vorliegen, die entsprechende zur oralen Verabreichung geeignete Träger enthalten können. Vorzugsweise liegen sie als orale Formulierungen vor.

Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen oder mehrere hypoglykämisch wirkende Wirkstoffe enthalten, die an sich bekannte Wirkstoffe sein können.

Die erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV bzw. der DP IVanalogen Enzymaktivität können zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus bzw. zur Herstellung eines entsprechenden Medikaments verwendet werden.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungen oder Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV-bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren

9

sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid und die in Tabelle 1 angegebenen Effektoren und deren Fumarsalze. Die erfindungsgemäßen Effektoren ermöglichen eine individuell einstellbare Behandlung von Patienten bzw. Krankheiten, wobei insbesondere individuell auftretende Unverträglichkeiten, Allergien und Nebenwirkungen vermieden werden können.

Auch weisen die Verbindungen unterschiedliche zeitliche Verläufe der Wirksamkeit auf. Dadurch wird dem behandelnden Arzt die Möglichkeit in die Hand gegeben, differenziert auf die individuelle Situation eines Patienten zu reagieren: Einerseits kann er die Geschwindigkeit des Eintritts der Wirkung und andererseits die Dauer der Wirkung und insbesondere die Stärke der Wirkung genau einstellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und
zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen,
die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, bei
Säugern und insbesondere in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten verabreicht, die den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien enthalten. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

10

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen pro Tag einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z.B. kann ein solcher Dosisbereich beim Menschen im Bereich von 0.01 mg bis 30.0 mg pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 0.01 bis 10 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Es wurde gefunden, daß durch Verabreichung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP<sub>1-42</sub>) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP- $1_{7-36}$ ) (o.a. GLP- $1_{7-37}$  oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert werden. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des
behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie
beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie
sowie mögliche schwere metabolische Azidosen und Diabetes mellitus, Krankheitsbilder die Folge einer über einen längeren

11

Zeitraum erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

In der Reihe der aus dem Stand der Technik bekannten, oral wirksamen Antidiabetika ist bisher eine derartig wirksame, niedermolekulare Substanzklasse (mit Ausnahme des Biguanides Metformin: Molekulargewicht 130) nicht bekannt. Die Molekulargewichte der Aminoacyl Thiazolidide bewegen sich zwischen 146 (Glycyl Thiazolidid), 203 (Isoleucyl Thiazolidid) und 275 (Tryptophanoyl Thiazolidid). Im Vergleich bewegen sich die Molekulargewichte der Sulphonylharnstoffe (Glibenclamid: 494), der Saccharide (Acarbose: 630) sowie der Thiazolidindione (Pioglitazon: 586) im Bereich um 500 bis 700 Da. Physiologisch werden Aminoacyl Thiazolidide durch Aminopeptidasen sowie durch saure Hydrolyse in körpereigene Substanzen, wie Aminosäuren und Cysteamin, hydrolysiert, so daß die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als oral verfügbare Antidiabetika eine Bereicherung der Pharmazie darstellt.

Bei Ratten und Mäusen ist experimentell induzierte Hyperglykämie durch orale Verabreichung mit den erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen überdurchschnittlich gut behandelbar (Tabellen 2 und 3). Die Verabreichung des 500- bis 1000-fachen
der wirksamen Dosis führte zu keiner nachweisbaren pathologischen Veränderung während drei-wöchiger toxikologischer Experimente an Ratten und Mäusen.

Die vorteilhafte Wirkung von erfindungsgemäßen Verbindungen auf DP IV ist in Tabelle 1 beispielhaft belegt:

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Effektoren auf die durch Dipeptidyl Peptidase IV katalysierte Hydrolyse von
0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH
7,6 und einer Ionenstärke von 0,125.

Effektor	Effektoraffinität zu	% Restaktivität der DP IV in
	DP IV: Ki [nM]	Gegenwart von 10 µM Effektor
Metformin	» 1.000.000	100
Glibenclamid	» 1.000.000	100
Acarbose	» 1.000.000	100
H-Asn-Pyrrolidid	12.000	83,1
H-Asn-Thiazolidid	3.500	47,2
H-Asp-Pyrrolidid	14.000	81,6
H-Asp-Thiazolidid	2.900	45,6
H-Asp(NHOH)-Pyrrolidid	13.000	88,2
H-Asp(NHOH)-Thiazolidid	8.800	54,5
H-Glu-Pyrrolidid	2.200	38,5
H-Glu-Thiazolidid	610	25,0
H-Glu(NHOH)-Pyrrolidid	2.800	44,9
H-Glu(NHOH)-Thiazolidid	1.700	36,5
H-His-Pyrrolidid	3.500	49,7
H-His-Thiazolidid	1.800	35,2
H-Pro-Pvrrolidid	4.100	50,2
H-Pro-Thiazolidid	1.200	27,2
H-Ile-Azididid	3.100	43,8
H-Ile-Pyrrolidid	210	12,3
H-L-allo-Ile-Thiazolidid	190	10,0
H-Val-Pyrrolidid	480	23,3
H-Val-Thiazolidid	270	13,6

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Pyrrolidide und Aminoacyl Thiazolidide durch die in den Mucosazellen des Dünndarms, im Serum und in Leberzellen vorhandenen Enzyme Prolin Aminopeptidase und Prolidase abgebaut werden können und der Thiazolidinring zur Öffnung in Gegenwart von Säuren (beispielsweise im Magen) unter Bildung des adäquaten Cysteamin-Derivates neigt [vgl. US 458407]. Es war daher überraschend, eine dosisabhängige Wirksamkeit der Wirkstoffe nach per oraler Verabreichung zu finden. Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von L-allo-Ile-Thiazolidid auf die Serum-DP IV Aktivität nach oraler Applikation von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid an gesunden Wistarratten ist mit folgender Tabelle belegt:

Tabelle 2: Restaktivität der DP IV im Serum gegenüber 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125, nach oraler Gabe und in Abhängigkeit von der Dosis L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, bestimmt 30 min nach Applikation des Inhibitors.

Dosis pro Versuchstier	Restaktivität der DP IV in %
0 mg	100
2,5 mg	52
5,0 mg	40
10 mg	28
20 mg	29

Ausgesprochen überraschend und wünschenswert ist die im diabetischen Tiermodell erzielte Glukose-reduzierende Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs L-allo-Isoleucyl Thiazolidid nach

14

seiner oralen Verabreichung bei zeitgleicher oraler Glukose-Stimulierung (Tabelle 3).

Zur Verstärkung der blutzuckersenkenden Wirkung verschiedener Antidiabetika werden häufig Kombinationen verschiedener oral wirksamer Antidiabetika eingesetzt. Da sich die antihyperglykämische Wirkung der efindungsgemäßen Effektoren unabhängig von anderen bekannten oral applizierbaren Antidiabetika entfaltet, eignen sich die erfindungsgemäßen Wirkstoffe analog in entsprechender galenischer Form, zur Erzielung des gewünschten normoglykämischen Effektes, zum Einsatz bei Kombinationstherapien.

Somit können die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen in an sich bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie z. B. Tabletten, Kapseln, Dragees, Pillen, Suppositorien, Granulate, Aerosole, Sirupe, flüssige, feste und cremeartige Emulsionen und Suspensionen und Lösungen unter Verwendung inerter, untoxischer, pharmazeutisch geeigneter Träger- und Zusatzstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei liegen die therapeutisch wirksamen Verbindungen jeweils vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0.1 bis 80, vorzugsweise von 1 bis 50 Masseprozent der Gesamtmischung vor, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Tabelle 3: Reduktion der zirkulierenden Blutglukose innerhalb 60 min nach oraler Verabreichung von 20  $\mu$ M L-allo-Ile-Thiazolidid an Ratten verschiedener Tiermodelle bei zeitgleichem Glukosetoleranztest (Angaben in % bezogen auf normoglykämische Werte).

Tiermodell	Glukosekonzentration in %	Glukosekonzentration in % L-
	Kontrolle	allo-lle-Thiazolidid behandelt
Wistarratte, normal	100	82
Wistarratte (Diabetes 2b - Model, dick)	100	73

Die gute Resorption der erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen durch Schleimhäute des gastrointestinalen Traktes ermöglicht die Anwendung von vielen galenischen Zubereitungen:

Die Substanzen können als Medikament in Form von Dragees, Kapseln, Beißkapseln, Tabletten, Tropfen, Sirup, aber auch als Zäpfchen oder als Nasensprays angewendet werden.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken des Wirkstoffs mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgatoren und/oder Dispergiermitteln, wobei z.B. im Fall des Einsatzes von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Als Hilfsstoffe seien beispielhaft aufgeführt: Wasser, untoxische organische Lösungsmittel, wie Paraffine (z. B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z. B. Rapsöl, Erdnußöl, Sesamöl), Alkohole (z.B. Ethylalkohol, Glycerin), Glykole (z.B. Propylenglykol, Polyetylenglykol); feste Trägerstoffe, wie z. B. natürliche Gesteinsmehle (z. B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z.B. Roh-, Milch- und Traubenzucker); Emulgiermittel, wie nichtionogene und anionische Emulgatoren (z.

16

B. Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, Alkylsulfonate und Arylsulfonate), Dispergiermittel (z.B. Lignin, Sulfitablaugen, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumlaurylsulfat) und gegebenenfalls Aromastoffe.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise enteral oder parenteral, insbesondere oral. Im Falle der enteralen Anwendung können Tabletten außer den genannten Trägerstoffen weitere Zusätze wie Natriumcitrat, Calciumcarbonat und Calciumphosphat, zusammen mit verschiedenen Zuschlagsstoffen, wie Stärke, vorzugsweise Kartoffelstärke, Gelatine und dergleichen enthalten. Weiterhin können Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum zum Tablettieren mitverwendet werden. Im Falle wäßriger Suspensionen und/oder Elixieren, die für orale Anwendungen gedacht sind, können die Wirkstoffe außer mit den oben genannten Hilfsstoffen zusätzlich mit verschiedenen Geschmacksaufbesserern oder Farbstoffen versetzt werden.

Bei einer parenteralen Anwendung können Lösungen der Wirkstoffe unter Verwendung geeigneter flüssiger Trägermaterialien eingesetzt werden. Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei intravenöser Applikation Mengen von etwa 0,01 bis 2,0 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht pro Tag zur Erreichung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen, und bei enteraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 2 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Versuchstieres oder Patienten bzw. der Art des Applikationsweges, aber auch aufgrund der Tierart und deren individuellem Verhalten gegenüber dem Medikament bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Fall der Applikation größer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehrere Einzelgaben über den Tag zu verteilen. Für die Applikation in der Humanmedizin ist der gleiche Dosierungsspielraum vorgesehen. Sinngemäß gelten hierbei auch die obigen Ausführungen.

## Beispiele für pharmazeutische Formulierungen

1. Kapseln mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid pro Kapsel:

Für ca. 10 000 Kapseln wird eine Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid Hydrochlorid	1,0	kg
Glycerin	0,5	kg
Polyethylenglykol	3,0	kg
Wasser	0,5	<u>kg</u>
	5,0	kg

18

Die Lösung wird nach an sich bekannter Weise in Weichgelatinekapseln abgefüllt. Die Kapseln sind zum Zerbeißen oder zum Schlucken geeignet.

2. Tabletten bzw. lackierte Tabletten oder Dragees mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid:

Die folgenden Mengen beziehen sich auf Herstellung von 100 000 Tabletten:

L-allo-Isoleucyl	Thiazolidid	Hydrochlorid,

fein vermahlen	10,0 kg
Glukose	4,35 kg
Milchzucker	4,35 kg
Stärke	4,50 kg
Zellulose, fein vermahlen	4,50 kg

Obige Bestandteile werden gemischt und anschließend mit einer Lösung, hergestellt aus

Polyvinylpyrrolidon		2,0	kg
Polysorbat		0,1	kg
und Wasser	ca.	5,0	kg

versehen und in an sich bekannter Weise granuliert, indem die feuchte Masse geraspelt und nach Zugabe von 0,2 kg Magnesiumstearat getrocknet wird. Die fertige Tablettenmischung von 30,0 kg wird zu gewölbten Tabletten von 300 mg Gewicht verarbeitet. Die Tabletten können nach an sich bekannter Weise lackiert oder dragiert werden.

Die technischen Daten bevorzugter Verbindungen werden nachstehend angegeben.

# Untersuchungen zu Ile-Thia\*Fumarat (Isomere) und anderen Salzen

Substanz	Ki	Fp (°C)	CE (min)	MS	[α]H <sub>2</sub> O
L-threo-IT*F	8*10 <sup>-8</sup>	150 <sup>DSC</sup>	160	203	-10,7 (405nm)
D-threo- IT*F	keine Hemmung	147	158	203	nicht bestimmt
L-allo-IT*F	2*10 <sup>-7</sup>	145-6	154	203	-4,58 (380nm)
D-allo-IT*F	keine Hemmung	144-6	150	203	4,5 (380nm)

IT\*F = Isoleucyl-Thiazolidid Fumarat

Die NMR und HPLC Daten bestätigen, daß es sich um die entsprechenden Substanzen handelte

### Meßbedingungen für die K<sub>i</sub>-Bestimmung der Substanzen

Enzym:

 $DPIV_{Schweineniere}$ , 0,75mg/ml, 18U/ml (GPpNA)

in 25mM Tris pH 7,6, 30% Ammoniumsulfat, 0,5mM EDTA, 0,5mM DTE

Stammlösung: 1:250 verdünnt in Meßpuffer

Puffer:

40mM HEPES pH 7,6, I=0,125 (KCl)

Substrat:

GPpNA\*HCl

Stammlösung: 2,1mM

Meßgerät:

Perkin-Elmer Bio Assay Reader, HTS 7000 Plus,

T=30°C λ= 405nm

Meßansatz:

100µl Puffer

100μl Substrat (3 verschiedene Konzentrationen 0,8mM – 0,2mM)

50 $\mu$ l Wasser/Inhibitor (7 verschiedene Konzentrationen 2,1 $\mu$ M - 32,8nM)

10µl Enzym

Puffer, Wasser/Inhibitor und Enzym wurden auf 30°C vortemperiert und die Reaktion durch die Zugabe von ebenfalls vortemperiertem Substrat gestartet.

Es wurden 4fach Bestimmungen durchgeführt.

Die Meßzeit betrug 10min.

#### Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztischmikroskop der Leica-Aktiengesellschaft, die Werte sind nicht korrigiert, oder an einem DSC-Gerät (bei Heumann-Pharma) bestimmt.

### **Optische Rotation**

Die Drehwerte wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem "Polarimeter 341" oder höher der Fa. Perkin Elmer aufgenommen.

### Meßbedingungen für die Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem "API 165" bzw. "API 365" der Fa. PE Sciex mittels Elektrosprayionisation (ESI) aufgenommen.

Es wird mit einer ungefähren Konzentration von  $c = 10 \mu g/ml$  gearbeitet, die Substanz wird in MeOH / H<sub>2</sub>O 50:50, 0,1 % HCO<sub>2</sub>H aufgenommen, die Infusion erfolgt mit Spritzenpumpe (20 $\mu$ l/min). Die Messungen erfolgten im Positivmodus [M+H]<sup>+</sup>, die ESI-Spannung beträgt U = 5600V.

Die Salze weisen die folgenden Daten auf:

IT*Salz	K <sub>i</sub>	M (gmol <sup>-1</sup> )	Fp (°C)
Succinat	5,1 e-8	522,73	116
Tartrat	8,3 e-8	352,41	122
Fumarat	8,3 e-8	520,71	156
Hydrochlorid	7,2 e-8	238,77	169
Phosphat	1,3 e-7	300,32	105

# Löslichkeitsuntersuchung der Salze des Ile-Thia

#### Ile-Thia\*Fum

Einwaage 10,55 mg entspricht 0,02 mmol (520,72 g/mol) Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

100 µl keine Lösung, optisch: keine Oberflächenbenetzung

ab 200 µl sukzessiver Beginn der Löslichkeit bei 400µl ist eine vollständiges Lösen zu beobachten 2,63 % Bei diesem Salz wurde also festgestellt, daß es kaum benetzbar ist und sich nicht zersetzt.

#### Ile-Thia\*Succ

Einwaage 16,6 mg entspricht 0,031 mmol (522,73 g/mol) Zugabe von 16  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  16  $\mu$ l keine Lösung, optisch "Aufsaugen" der Feuchtigkeit von 66  $\mu$ l – 1,5 ml kein vollständiges Lösen der Substanz zu beobachten

#### Ile-Thia\*Tartrat

Einwaage 17,3 mg entspricht 0,049 mmol (352,41 g/mol) Zugabe von 100 μl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 100 μl vollständiges Lösen 17,3 %

#### Ile-Thia\*Phos

Einwaage 15,5 mg entspricht 0,051 mmol (300,32 g/mol) Zugabe von 100  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  100  $\mu$ l Anlösen ist zu beobachten sukzessive Zugabe von 100  $\mu$ l  $H_2O$  bei 400  $\mu$ l vollständiges Lösen 3,87 %

#### Ile-Thia\*HCl

Einwaage 16,1 mg entspricht 0,067 mmol (238,77 g/mol) Zugabe von 100  $\mu$ l  $H_2O_{dest}$  bei 100  $\mu$ l vollständiges Lösen 16,1 %

#### Allgemeine Synthese Ile-Thia\*Salz

Die Boc-geschüzte Aminosäure Boc-Ile-OH wird in Essigsäureethylester vorgelegt, der Ansatz wird auf ca. –5 °C gekühlt. N-Methylmorpholin wird zugetropft, Pivalinsäurechlorid (Labor) bzw. Neohexanoylchlorid (Technikum) wird unter Temperaturkonstanz zugetropft. Die Reaktion wird für wenige Minuten zur Aktivierung gerührt. N-Methylmorpholin (Labor) und Thiazolidinhydrochlorid (Labor) werde nacheinander zugetropft, Thiazolidin (Technikum) wird zugegeben. Die Aufarbeitung im Labor erfolgt klassisch mit Salzlösungen, im Technikum wird der Ansatz mit NaOH- und CH<sub>3</sub>COOH-Lösungen gereinigt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird durch HCl / Dioxan (Labor) bzw. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Technikum) erzielt.

Im Labor wird das Hydrochlorid aus EtOH / Ether kristallisiert. Im Technikum wird das freie Amin durch Zugabe von NaOH / NH<sub>3</sub> dargestellt. Fumarsäure wird in heißen Ethanol gelöst, das freie Amin wird zugetropft, es fällt (Ile-Thia)<sub>2</sub>-Fumarat (M = 520,71 gmol<sup>-1</sup>).

Die Analytik von Isomeren bzw. Enantiomeren erfolgt durch Elektrophorese.

### Patentansprüche

- Dipeptidverbindung, die aus einer Aminosäure und einer Thiazolidin- oder Pyrrolidingruppe gebildet wird, und deren Salze.
- Dipeptidverbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus einer natürlichen Aminosäure ausgewählt wird.
- 3. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei einer Konzentration von 10 μM eine Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 10 % bewirkt.
- 4. Dipeptidverbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aktivitätsminderung von mindestens 40 % bewirkt.
  - 5. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure aus Leucin, Valin, Glutamin, Prolin, Isoleucin, Asparagin und Asparaginsäure ausgewählt wird.
  - 6. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich L-threo-Isoleucyl Pyrrolidid, L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, l-allo-Isoleucyl Pyrrolidid und deren Salze.
  - 7. Dipeptidverbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Salze organische Salze wie

- Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sind.
- 8. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einem molaren Verhältnis von Dipeptidverbindung zu Salz von 1: 1
  oder 2: 1 vorliegen.
- 9. Salze von Dipeptidverbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, nämlich Fumarsalze.
- 10. Salze von Dipeptidverbindungen nach Anspruch 9, nämlich Fumarsalze von L-threo-Isoleucyl Thiazolidid oder Fumarsalze von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid.
- 11. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Verbindung oder deren Salze nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthält.
- 12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Träger für parenterale oder enterale Formulierungen handelt.
- 13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Formulierung zur oralen Verabreichung vorliegt.
- 14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen hypoglykämisch wirkenden Wirkstoff enthält.

- 15. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV analogen Enzymaktivitäten.
- 16. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung
  eines Medikaments zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter
  die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säugers.
- 17. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung
  eines Medikaments zur oralen Behandlung von mit Diabetes
  mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen.
- 18. Verwendung von mindestens einer Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Kapillarzonenelektrophorese (CE) -Trennung der Isomere des Isoleucyl Thiazolidids

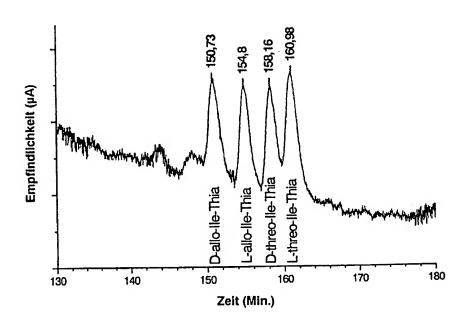


Abb. 1: CE-Trennung von einer 1:1:1:1 – Mischung von L-threo-Ile-Thia\*Fum, L-allo-Ile-Thia\*Fum, D-threo-Ile-Thia\*Fum, D-allo-Ile-Thia\*Fum

2/3

### Methode und Meßbedingungen:

CE-Untersuchungen erfolgten am "P/ACE™ System MDQ" der Firma Beckman:

Substanz	CE (min)		
L-threo-IT*F	160		
D-threo-IT*F	158		
L-allo-IT*F	154		
D-allo-IT*F	150		

### Laufbedingungen:

Puffer:

20 mM Phosphat, pH 7,0, 100 mM  $\beta$ -Hydroxy-propyl-cyclodextrin

Kapillare:

50 / 60,2 cm, 25 μm Innendurchmesser, beschichtet mit Acrylamid

Spannung:

10 kV

Detektion:

Photo-Dioden-Array-Detektor bei 214 nm

Temperatur: 7°C

# CE-Trennung von Ile-Thia\*Fumarat

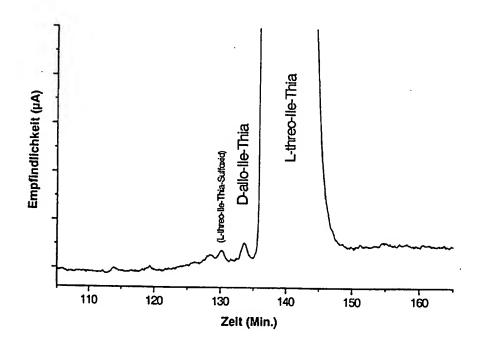


Abb. 2: CE-Trennung von einer 1:1000 Mischung L-threo-Ile-Thia\*Fumarat zu D-allo-Ile-Thia\*Fumarat

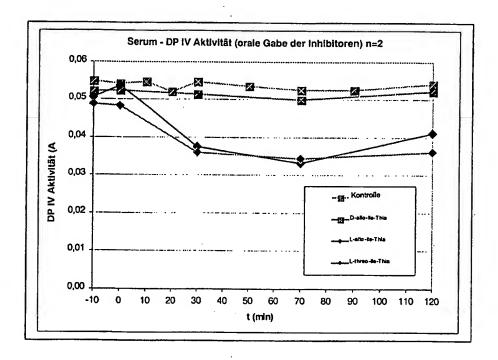
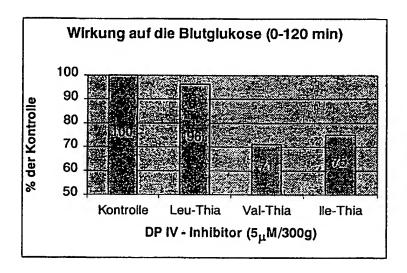


Abb. 3: Serum DP IV-Aktivität nach oraler Applikation verschiedener H-Ile-Thia Stereoisomere (5 μM/300 g Ratte). Beeinflussung der Enzymaktivität erflolgt nur durch L-allo-Ile-Thia und L-threo-Ile-Thia.

Abb. 4: Wirkung verschiedener Aminoacyl-Thiazolidide auf die Glukosetoleranz der Ratte (Oraler Glukosetoleranztest mit 2g/300g Wistarratte zum Zeitpunkt 0, Gabe der DP IV-Inhibitoren 10 min vor oraler Glukosestimulierung)



International Application No PCT/EP 99/03712

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
PC 6 C07D277/04 A61K31/425 C07D295/18 C07D417/12 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07D A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No. X WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTITUT FÜR 1-18 NATURSTOFF-FORSCHUNG) 6 November 1997 (1997-11-06) cited in the application claims; examples 2,3 X WO 95 15309 A (FERRING BV ) 1-18 8 June 1995 (1995-06-08) claims Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents : "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance invention "E" earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report 3 September 1999 17/09/1999 Name and mailing address of the ISA **Authorized officer** European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 ... NL - 2280 HV Rijswijk Tei. (+31~70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Henry, J Fax: (+31-70) 340-3016

1

Internacional Application No
PCT/EP 99/03712

C.(Continu	uation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	rc1/Er 99/03/12
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14 October 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" page 37; XP002114197 abstract & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, vol. 372, no. 5, 1991, pages 305-311,	1-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21 November 1991 (1991-11-21) cited in the application abstract	1-18
<b>X</b>	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13 January 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" page 241; XP002114198 abstract & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., no. 14, 1995, pages 709-710,	1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21 June 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, page 933; XP002114199 abstract & JP 04 334357 A (FUJEREBIO INC) 20 November 1992 (1992-11-20)	1-18

International Application No
PCT/EP 99/03712

		PCI/EP 99	7 0 3 7 1 2
	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
X	HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of prolyl endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 41, no. 9, 1993, pages 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009-2363	1-8	
	the whole document		

1

ormation on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/03712

					•
Patent document cited in search repo		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9740832	Α	06-11-1997	DE 19616486	Α	30-10-1997
			AU 3023397	Α	19-11-1997
			CN 1216468	A	12-05-1999
			EP 0896538	A	17-02-1999
WO 9515309	А	08-06-1995	AU 1113395	A	19-06-1995
			AU 8421998	Α	12-11-1998
		•	CA 2178066	Α	08-06-1995
			CN 1141033	Α	22-01-1997
		•	CZ 9601595	Α	15-01-1997
			EP 0731789	Α	18-09-1996
			FI 962315	Α	05-08-1996
			HU 76274	A	28-07-1997
			JP 9509921	T	07-10-1997
			NO 962269	Α	30-07-1996
			PL 314838	Α	30-09-1996
			ZA 9409525	Α	02-08-1995
DD 296075	Α	21-11-1991	NONE		
JP 4334357	Α	20-11-1992	NONE		

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interna..onales Aktenzeichen PCT/EP 99/03712

A. KLASS IPK 6	ifizierung des anmeldungsgegenstandes CO7D277/04 A61K31/425 CO7D295/	18 C07D417/12	
<b>A</b> 1111	D. A. H. L. W.	officers and the second	į ·
	nternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klas	sitikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE erter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo	le )	
IPK 6	CO7D A61K		
Recherchie	erte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen
Während d	fer internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N.	ame der Datenbank und evtl. verwendete	Suchbegriffe)
C. ALS W	ESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 40832 A (HANS KNÖLL INSTITU NATURSTOFF-FORSCHUNG) 6. November 1997 (1997-11-06) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche; Beispiele 2,3	T FÜR	1-18
X	WO 95 15309 A (FERRING BV ) 8. Juni 1995 (1995-06-08) Ansprüche		1-18
	·	·/	
	eitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Inehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"A" Veröff aber "E" älteres Anm "L" Veröff sche ande soll c ausg "O" Veröff dem	fentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedautsam anzusehen ist s Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist fentlichung, die gesignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- einen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie jeführt) fentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht fentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	kann nicht als auf erfinderischer Tätigl werden, wenn die Veröffentlichung mi Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmanr "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselbei	t worden ist und mit der ir zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden utung; die beanspruchte Erfindung chung nicht als neu oder auf achtet werden utung; die beanspruchte Erfindung etwage die beanspruchte Erfindung etwage der mehreren anderen verbindung gebracht wird und naheliegend ist n Patentfamilie ist
	s Abschlusses der Internationalen Recherche  3. September 1999	Absendedatum des internationalen Re 17/09/1999	echerchenberichts
	l Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Henry, J	

1

### INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internacionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03712

		PCI/EP 9	9/03/12
C.(Fortsetz	rung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme:	nden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 115, no. 15, 14. Oktober 1991 (1991-10-14) Columbus, Ohio, US; abstract no. 149947q, SCHOEN EKKEHARD ET AL: "Dipeptidyl peptidase IV in the immune system.Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes" Seite 37; XPO02114197 Zusammenfassung & BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER, Bd. 372, Nr. 5, 1991, Seiten 305-311,		1-18
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER-UNIV. HALLE), 21. November 1991 (1991-11-21) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung		1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 126, no. 2, 13. Januar 1997 (1997-01-13) Columbus, Ohio, US; abstract no. 16161j, STOECKEL A. ET AL: "Competitive inhibition of proline specific enzymes by amino acid thioxopyrrolidides and thiazolidides" Seite 241; XP002114198 Zusammenfassung & PEPT: CHEM.,STRUCT.BIOL.,PROC.AM. PEPT.SYMP., Nr. 14, 1995, Seiten 709-710,		1-18
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 25, 21. Juni 1993 (1993-06-21) Columbus, Ohio, US; abstract no. 255342k, Seite 933; XP002114199 Zusammenfassung & JP 04 334357 A (FUJEREBIO INC) 20. November 1992 (1992-11-20) ————————————————————————————————————		1-18

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internacionales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03712

HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of proly! endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of proly! endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 41, Nr. 9, 1993, Seiten 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009-2363	nspruch Nr.
HEIHACHIRO ET AL: "Synthesis of proly! endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of proly! endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 41, Nr. 9, 1993, Seiten 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009-2363	nspruch Nr.
endopeptidase inhibitors and evaluation of their structure-activity relationships: in vitro inhibition of prolyl endopeptidase" CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 41, Nr. 9, 1993, Seiten 1583-1588, XP002114196 PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP ISSN: 0009-2363	
das ganze Dokument	1-8

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichun die zur selben Patentlamilie gehören

Internacionales Aktenzeichen PCT/EP 99/03712

	herchenberich s Patentdokur		Datum der Veröffentlichung		itglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9	740832	Α	06-11-1997	DE AU CN	19616486 A 3023397 A 1216468 A	30-10-1997 19-11-1997 12-05-1999
				EP	0896538 A	17-02-1999
WO 9	515309	Α	08-06-1995	AU	1113395 A	19-06-1995
				AU	8421998 A	12-11-1998
				CA	2178066 A	08-06-1995
				CN	114 <b>103</b> 3 A	22-01-1997
				CZ	9601595 A	15-01-1997
				EP	0731789 A	18-09-1996
				FI	962315 A	05-08-1996
				HU	76274 A	28-07-1997
				JP	9509921 T	07-10-1997
				NO	962269 A	30-07-1996
				PL	314838 A	30-09-1996
				ZA	9409525 A	02-08-1995
DD 2	96075	A	21-11-1991	KEIN	E	2 <b></b>
JP 4	334357	Α	20-11-1992	KEIN	IE	

# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

### INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C07K 5/078, 5/083, 5/097, A61K 38/05, 38/06

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/67278

**A1** 

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

29. Dezember 1999 (29.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP99/04382

(22) Internationales Anmeldedatum:

24. Juni 1999 (24.06.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 28 113.7

24. Juni 1998 (24.06.98)

DF

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRO-BIODRUG GESELLSCHAFT FÜR ARZNEIMIT-TELFORSCHUNG MBH [DE/DE]; Weinbergweg 22, D-06120 Halle (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Weinbergweg 23, D-06120 Halle (DE). HOFF-MANN, Torsten [DE/DE]; Körnerstrasse 8, D-06114 Halle (DE). SCHLENZIG, Dagmar [DE/DE]; Hegelstrasse 12, D-06114 Halle (DE). MANHART, Susanne [DE/DE]; Rudolf-Haym-Strasse 21, D-06110 Halle (DE).
- (74) Anwälte: FORSTMEYER, Dietmar, G. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PRODRUGS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS

(54) Bezeichnung: PRODRUGS VON DP IV-INHIBITOREN

### (57) Abstract

The invention relates to prodrug compounds of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV). Said prodrug compounds comprise general formulas (A-B-C), whereby A represents an amino acid, B represents the chemical bond between A and C or an amino acid, and C represents a stabile inhibitor of DP IV. Such prodrug compounds are used for treating altered glucose tolerance, glucosuria, hyperlipidemia, metabolic acidoses, diabetes mellitus, diabetic neuropathy, nephropathy, and secondary diseases in mammals caused by diabetes mellitus.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Prodrug-Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Prodrug-Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei A eine Aminosäure, B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure und C ein stabiler Inhibitor von DP IV ist. Derartige Prodrug-Verbindungen werden zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern verwendet.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	Œ	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien ·	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 99/67278 PCT/EP99/04382

### Prodrugs von DP IV-Inhibitoren

Erfindungsgemäß werden Prodrug-Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) bereitgestellt, welche Prodrug-Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

### A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein stabiler Inhibitor von DP IV ist.

Es wurde gefunden, daß durch Verabreichung von Inhibitoren (Effektoren) der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP,,,) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1,-36) (o.a. GLP-1,-37, oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristi-

sche Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Dadurch können mittels DP IV - Inhibitoren Stoffwechselanomalien wie Übergewicht, Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, Diabetes mellitus, die eine Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden [vgl. DE 196 16 486].

Mit Hilfe von DP IV - Inhibitoren kann auch das Eindringen von HIV in CD 26 (DP IV) positive Zellen experimentell verhindert werden [vergl. WAKSELMAN, M., NGUYEN, C., MAZALEYRAT, J.-P., CALLEBAUT, C., KRUST, B., HOVANESSIAN, A.G., Inhibition of HIV-1 infection f CD 26+ but not CD26- cells by a potent cyclopeptidic inhibitor of the DPP IV activity of CD 26. Abstract P 44 of the 24<sup>th</sup> European Peptide Symposium 1996].

Weiterhin wurde gefunden, daß DP IV neuroaktive Peptide wie Neuropeptid Y und CLIP in ihrer Aktivität modulieren kann [vergl. MENTLEIN, R., DAHMS, P., GRANDT, D., KRUGER, R., Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase IV. Regul. Pept. 49, 133 (1993); WETZEL, W., WAGNER, T., VOGEL, D., DEMUTH, H.-U., BALSCHUN, D., Effects of the CLIP fragment ACTH 20-24 on the duration of REM sleep episodes. Neuropeptides, 31, 41 (1997)].

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Effektoren von DP IV bereitzustellen, die im Vergleich zu bekannten Inhibitoren eine gesteigerte Wirkung aufweisen und deren Wirkung zeitlich definiert eintritt.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung von Prodrug-Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)

gelöst, welche Prodrug-Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

A eine Aminosäure

B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und

C ein stabiler Inhibitor von DP IV ist.

Überraschenderweise weisen derartige als Prodrugs maskierte Inhibitoren gegenüber nicht maskierten Inhibitoren eine erheblich gesteigerte Wirksamkeit auf: Werden identische Mengen von unmaskierten Inhibitoren der DP IV und von erfindungsgemäßen Prodrugverbindungen eingesetzt, so kommt es bei Wistarratten durch die Prodrug-Verbindungen zu einer Glukosetoleranzverbesserung von bis zu 75 %, siehe auch Tabelle 4.

Diese Verbesserung ist umso erstaunlicher, als gefunden wurde, daß unmaskierte Inhibitoren der DP IV zu 100 % aus dem Magen-Darmtrakt von Säugern resorbiert werden und in den vaskulären Bereich des Körpers eintreten. Es wäre also zu erwarten gewesen, daß Prodrug-Verbindungen, die normalerweise nur eine Zersetzung von oral verabreichten Verbindungen im Magen-Darmtrakt verhindern sollen, zu keiner Steigerung der Wirksamkeit der Inhibitoren führen würden. Es sei nur am Rande vermerkt, daß für einen Fachmann aufgrund dieser Tatsachen außerdem auch gar keine Veranlassung bestand, nach modifizierten Inhibitoren zu suchen, auch wenn Prodrug-Verbindungen an sich bereits bekannt waren, vgl. z.B. PCT/US 97/09421.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Prodrug-Verbindungen eingesetzt, in denen B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin,

Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist, wobei Prolin und Hydroxyprolin besonders bevorzugt werden. Vorzugsweise stellt B eine Peptidbindung zwischen A und C dar oder ist über Peptidbindungen mit A und C verknüpft.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen dabei insbesondere auch den Vorteil auf, daß die Inhibitoren der DP IV je nach individuellem Bedarf der Patienten freigesetzt werden:

Tritt eine erfindungsgemäße Prodrug-Verbindung mit einem DP IV-Molekül in Wechselwirkung, so wird sie durch das Enzym in die Gruppen A-B und den Inhibitor C gespalten. Der Inhibitor C wird das DP IV-Molekül inhibieren, so daß es keine weiteren Prodrug-Verbindungen mehr aufspalten kann. Liegen weitere DP IV-Moleküle vor, so kommt es so lange zur Spaltung von Prodrug-Verbindungen (wenn eine ausreichende Menge an Prodrug-Verbindungen verabreicht wurde), bis das letzte DP IV-Molekül inhibiert ist. Die übrigen Prodrug-Verbindungen werden nicht zersetzt und stellen somit so lange ein Inhibitordepot dar, bis die Konzentration an DP IV-Molekülen wieder ansteigt bzw. Inhibitormoleküle von der DP IV verdrängt werden bzw. Inhibitormoleküle eliminiert werden und es wiederum zu einer erneuten Spaltung der Prodrug-Verbindungen und somit zu einer Freisetzung von Inhibitoren kommt.

Die Erfindung weist also den weiteren Vorteil auf, daß jeder Organismus genau die Menge an Inhibitor freisetzen wird, die zur Inhibierung der individuell in unterschiedlicher Menge vorliegenden DP IV notwendig ist. Liegt bei einem Patienten DP IV z.B. in hohen Konzentrationen vor, so wird eine große Menge an Inhibitor freigesetzt; liegt nur eine wenig erhöhte Konzentration an DP IV vor, so wird nur eine geringe Menge an Inhibitor freigesetzt.

WO 99/67278

5

Weiter werden erfindungsgemäß Prodrug-Verbindungen bevorzugt, in denen C ein Aminoacylpyrrolidid, Aminoacylthiazolidid oder N-Dipeptidyl, O-Acyl Hydroxylamin ist. Derartige Inhibitoren haben sich als besonders wirksame DP IV-Inhibitoren herausgestellt. Als Beispiele derartiger Inhibitoren können z.B. Ile-Thia, Ile-Pyr, Val-Thia und Val-Pyr genannt werden.

Die Inhibitoren (Komponente C) können erfindungsgemäß auch in Salzform vorliegen, wobei organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate bevorzugt werden. Besonders bevorzugt werden Fumarate.

Insbesondere werden Verbindungen bevorzugt, in denen A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft also neue Prodrug-Verbindungen von Inhibitoren der Serinpeptidase Dipeptidyl Peptidase IV, die zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen insbesondere von mit Diabetes mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen eingesetzt werden können.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen besteht darin, daß der Wirkungseintritt und auch die Wirkungsdauer der DP IV-Inhibitoren durch geeignete Auswahl der Gruppen A-B zeitlich gesteuert werden kann. Insbesondere hängt die Freisetzung der Gruppen A-B aus den erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen von der Natur des Aminosäurerestes von A ab: Bezüglich der Definition der Gruppe A wurde insbesondere folgende Reihenfolge der Freisetzungsgeschwindigkeit der Reste A-B aus den Prodrug-Verbindungen A-B-C durch DP IV gefunden: Ile<Val<Phe<Pro<Ala<Gly. Die Geschwindigkeitskonstanten der</pre>

entsprechenden DP IV-katalysierten Freisetzungen liegen zwischen 1 s<sup>-1</sup> und 100 s<sup>-1</sup>. Damit steht ein Mittel zur Verfügung, die DP IV-Inhibitoren zeitlich exakt definiert freizusetzen: Soll die Wirkung der Enzyme sofort, z.B. bei Aufnahme Glukosereicher Nahrung eintreten, so wird eine Verbindung A-B-C gewählt, die als Gruppe A z.B. die Aminosäure Gly aufweist; soll erst eine verzögerte Wirkung des Inhibitors eintreten, so kann als Gruppe A z.B. die Aminosäure Ile ausgewählt werden. DP IV-Inhibitoren können durch die erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen also insbesondere nahezu verzögerungsfrei, z.B. nahezu gleichzeitig mit aufgenommenen Nahrungsmitteln durch die Dünndarmmucosa transportiert werden.

Stellt B eine Bindung dar, so ist es insbesondere eine Peptidbindung; stellt B eine Aminosäure dar, so ist diese vorzugsweise über Peptidbindungen mit A und C verknüpft.

Bei der Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehungen des DP IV Inhibitors Isoleucyl Thiazolidid als Modulator der Blutglukosekonzentration im Säugetierorganismus kann ein Unterschied zwischen oraler und parenteraler Applikation des Wirkstoffes an Wistarratten festgestellt werden: Bei oraler
Applikation wurde eine Sättigung der Aufnahme des Wirkstoffs
(gemessen an der Inhibierung des Serumenzyms) beobachtet,
während bei parenteraler Applikation des Inhibitors eine
vollständige Hemmung des Enzyms beobachtet wurde. Das ist in
Tabelle 1 beispielhaft belegt:

Tabelle 1: Restaktivität der DP IV gegenüber 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125, nach i.v. und p.o. Gabe und in Abhängigkeit von der Dosis Isoleucyl Thiazolidid (Ile-Thia), bestimmt 30 min nach Applikation des Inhibitors.

Ile-Thia Dosis bei	DP IV- Aktivität in	He-Thia Dosis bei	DP IV- Aktivität in
parenteraler Gabe	%	oraler Gabe	%
0 mg	100	0 mg	100
0,02 mg	80	2,5 mg	52
0,2 mg	32	5,0 mg	40
2 mg	5	10 mg	28
20 mg	0	20 mg	29

Da auch im Darm Enzyme, insbesondere hohe Konzentrationen an DP IV, vorhanden sind, die die abspaltbaren Gruppen von Prodrugs abspalten und damit das Medikament freisetzen können, und ferner – wie bereits erwähnt – gefunden wurde, daß DP IV Inhibitoren quantitativ aus dem Magen-Darmtrakt resorbiert werden, war zu erwarten, daß der Einsatz von Prodrug-Verbindungen von DP IV-Inhibitoren keine Verbesserung dieser Situation bringen würde.

Es war daher ausgesprochen überraschend, daß gefunden wurde, daß die erfindungsgemäßen Prodrugs von DP IV-Inhibitoren gegenüber den korrespondierenden unmaskierten DP IV - Inhibitoren eine deutlich verstärkte Glukosetoleranz im Glukosetoleranztest bewirken. Dieses Verhalten war insofern besonders überraschend als die Prodrugs - wie vorstehend erwähnt -

WO 99/67278 PCT/EP99/04382

8

bereits im Darm durch dort vorliegende Enzyme wie die Dipeptidylpeptidase gespalten werden können und somit genau wie die unmaskierten Inhibitoren nicht mehr für einen Transport an den Zielort zur Verfügung stehen sollten:

Sobald die Prodrug-Verbindungen durch im Darm vorliegende DP IV oder andere Enzyme gespalten werden, werden die erfindungsgemäßen Inhibitoren freigesetzt, wodurch es genau wie beim Einsatz von unmaskierten Inhibitoren zu einer Inhibierung der DP IV kommt. Folglich findet kein weiterer Abbau der Prodrug-Verbindungen durch DP IV mehr statt; alle noch unzersetzt vorliegenden oder zusätzlich zugeführten Prodrug-Verbindungen können ebenso wie überschüssige, das heißt nicht an DP IV gebundene unmaskierte Inhibitoren unzersetzt aus dem Magen-Darm-Trakt in den vaskulären Bereich eines Körpers übertreten. Dort können sie dann, wie vorstehend erwähnt, je nach individuellem Bedarf als DP IV Inhibitoren eingesetzt werden. Doch auch die im Darm an DP IV gebundenen Inhibitoren werden nach einer gewissen Zeit wieder freigesetzt und treten in den vaskulären Bereich ein.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen kann also auch eine erwünschte Wirkungsverstärkung *in vivo* erreicht werden.

Ferner kann auch der Freisetzungs- und Wirkungsort der DP IV-Inhibitoren durch die Art der Reste A-B gesteuert werden:

Im Blut von Säugern liegen neben der Dipeptidyl Peptidase IV verschiedene andere Aminopeptidasen wie z.B. Pyroglutamyl Aminopeptidase und Prolyl Aminopeptidase vor. Durch geeignete Auswahl der Reste A-B kann erfindungsgemäß festgelegt werden,

durch welche Aminopeptidase der DP IV-Inhibitor freigesetzt werden soll und somit bestimmt werden, wo die Wirkung des Inhibitors eintreten soll. Die erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen oder entsprechende pharmazeutische Zusammensetzungen können also auch zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibierung von DP IV eingesetzt werden. Die Gruppen A-B können auch so ausgewählt werden, daß nur solche Enzyme angesprochen werden, die nur vaskulär präsent sind und die die Inhibitoren mit ausreichend hoher Geschwindigkeit freisetzen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen von DP IV-Inhibitoren in völlig übberaschender Weise:

- 1. Eine erhöhte Wirkung der Inhibitoren erreicht werden kann;
- Die Freisetzung der Inhibitoren je nach Bedarf der Patienten erfolgen kann;
- 3. Die Freisetzung der Inhibitoren aus den Prodrug-Verbindungen zeitlich gesteuert erfolgen kann;
- 4. Die Freisetzung der Inhibitoren aus den Prodrug-Verbindungen bezüglich des Freisetzungsorts gesteuert werden kann; und
- 5. Ein Depot von DP IV-Inhibitoren bereitgestellt werden kann.

Erfindungsgemäß werden außerdem pharmazeutische Zusammensetzungen insbesondere zur oralen Verabreichung bereitgestellt, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie mindestens
eine erfindungsgemäße Prodrug-Verbindung gegebenenfalls in
Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.

Die erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen oder sie enthaltende pharmazeutischen Zusammensetzungen können zur Behandlung oder Prophylaxe von Erkrankungen von Säugern eingesetzt werden, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können, wie z.B. von Stoffwechselerkrankungen von Menschen.

Insbesondere können sie zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern eingesetzt werden.

### Beispiele

- 1. Synthese von erfindungsgemäßen Prodrugverbindungen
- 1.1. Synthese von H-Pro-Ile-Thia / HCl

6,5 mM Boc-Pro-Ile-OH (ein Equivalent = 1 eq.) werden mit N-Hydroxybenzotriazol (1 eq.) und Thiazolidin (1 eq.) in 30 ml Dichlormethan (DCM) suspendiert. Bei -10 °C wird unter Rühren die equivalente Menge einer 1 M Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung zugetropft. Man läßt bei -10 °C und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) rühren. Zur Aufarbeitung wird gründlich vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, DCM im Vakuum abgezogen und der erhaltene Rückstand in Essigester aufgenommen. Die Essigesterlösung wird mindestens dreimal mit gesättigter Bicarbonat-Lösung, einmal mit gesättigter NaCl-Lösung, dreimal mit verdünnter KHSO4-Lösung und nochmals mit NaCl-Lösung gewaschen. Die Essigesterphase wird über Na,SO4 getrocknet, einro-

tiert und das verbleibende Rohprodukt mit Essigester/Pentan umkristallisiert. Boc-Pro-Ile-Thia kristallisiert nach 1-2 Tagen bei 4°C (Ausbeute 80%). Boc-Pro-Ile-Thia wird mit 1,1 N HCl/Eisessig-Lösung (3 ml pro mmol Peptid) versetzt. Man läßt zwei Stunden bei RT rühren, versetzt mit absolutem Ether und dampft überschüssige Abspaltungslösung am Rotationsverdampfer ab. Das Hydrochlorid kristallisiert quantitativ unter absolutem Ether über Nacht bei 4°C. Man saugt die Kristalle schnell unter mehrfachem Waschen mit absolutem Ether ab und bewahrt das Produkt im Ekksikator über KOH oder Phosphorpentoxid auf.

# 1.2. Synthese von H-Gly-Pro-Ile-Thia / HCl

Boc-Gly-OH (1 eq.) wird in 20 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst, auf -10 °C gekühlt und unter Rühren nacheinander mit N-Methylmorpholin (1 eq.) und Chlorameisensäureisobutylester (1 eq.) versetzt. Man läßt etwa 20 min aktivieren. Parallel dazu wird Pro-Ile-Thia x HCl (1 eq.) in 10 ml THF suspendiert auf -10 °C temperiert und mit N-Methylmorpholin (1 eq.) zur Neutralisation versetzt. Nach beendeter Aktivierungszeit werden beide Lösungen miteinander vermischt, nach ein bis zwei Stunden auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser versetzt und THF im Vakuum abdestilliert. Der verbleibende Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mindestens dreimal mit gesättigter Natrium Bicarbonatlösung, einmal mit gesättigter NaCl-Lösung, dreimal mit verdünnter KHSO, und nochmals mit NaCl-Lösung gewaschen. Man trocknet die Essigesterphase über Na, SO4, rotiert ein und kristallisiert das Product Boc-Gly-Pro-Ile-Thiazolidid mit Essigester/Pentan um (Ausbeute 85 %). Die Boc-Abspaltung wird

analog der Synthese von H-Pro-Ile-Thia / HCl durchgeführt (Ausbeute > 95 %).

Tabelle 2: Analysedaten von Prodrugs von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV

Substanz	MG be- rechnet [g/mol]	MG gefun- den M+H'	CE Reinheit Retentions- zeit (Rt)	HPLC Rein- heit Rt	Schmelz- punkt °C
pGlu-Ilc-Thia*HCl	349,84	314,8	4,2 min	10,4min	30-40
Pro-Ile-Thia*HCl	335,90	300,8	4,5 min	10,05 min	45-69
Gly-Pro-Ile-Thia*HCl	392,94	357,8	4,6 min	8,8 min	111-121
lle-Pro-lle-Thia*HCl	449,05	413,6	5,6 min	10,0 min	98-107
Pro-Pro-Ile-Thia*HCl	433,01	397,6	5,3 min	11,35 min	101-118

Bedingungen für die Analytik:

HPLC Säule: LiChrospher 250-4, 100 RP-18,5μm, Temperatur 25°C

Elucnt: 30% ACN, 0,1% TFA, isokratisch, Flußgeschwindigkeit 0,5ml/min

Detektionswellenlänge: 210nm

CE Kapillare: 30cmx50µm fused silica, Temperatur 25°C

Detektionswellenlänge: 200nm

Injektion: 5sec, 50mbar

Trennung: 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 2,5; Dauer 7min bei 12kV

# 2. Affinität und Transport verschiedener Peptide, DP IV-Inhibitoren und Prodrugs zum Peptidtransporter PepT1

Die Affinität verschiedener Peptide, DP IV-Inhibitoren und Prodrugs von Inhibitoren der DP IV zum Peptidtransporter PepT1 wurde mittels Verdrängung des radioaktiv markierten Substrates D-Phe-Ala analysiert [AMASHEH, S., WENZEL, U., WEBER, W.M., CLAUSS, W., DANIEL, H., Electrophysiological analysis of the

function of the mammalian renal peptide transporter expressed in Xenopus laevis oocytes. J. Physiol. 504, 169-174 (1997)]. Dabei zeigt sich, daß beispielsweise das Tetrapeptidderivat Ile-Pro-Ile-Thia vergleichbar bzw. besser als ausgewählte Aminosäure Derivate an das Transporterprotein PepTl gebunden und im Vergleich zu ausgewählten Aminosäure- bzw. Peptidanaloga ähnlich oder besser transportiert wird (Tabelle 3).

Tabelle 3: Transporteigenschaften verschiedener Aminosäure- und Peptidderivate am humanen Peptidtransporter PepT1

Aminosäure- bzw. Peptidderivat	Elektrophys. Transportanalyse (hPEPT1 in Oocyten expr.), Flux % zur Kontr. Gly-Gln (100 %)	Bindungskonstante mM zu PepT1, relativ zu D-Phe-Ala
Lys-Phe	95	0,08
Lys-Phe-Pro	10	0,19
Asn-Pyr	30	3,01
Asn-Thia	83	0,50
His-Pyr	7	5,34
His-Thia	12	0,57
lle-Pyr	14	2,66
Ile-Thia	25	0,98
Ile-Pro-Ile-Thia	44	0,61

Freisetzung des aktiven DP IV-Inhibitors Ile-Thia aus erfindungsgemäßen Prodrugs in humanem Vollblut

Gemäß einer Ausführungsform von erfindungsgemäßen Prodrugs von DP IV-Inhibitoren ist auch eine retardierte Freisetzung von DP IV-Inhibitoren im Zielkompartiment, z.B. im Blutkreislauf möglich.

In Abbildung 1 ist die zeitabhängig differenziert verlaufende Inhibierung von humaner Blut-DP IV durch Freisetzung des Inhibitors Isoleucyl Thiazolidid aus erfindungsgemäßen Prodrug-Verbindungen exemplarisch dargestellt. Die Freisetzung des maskierten DP IV-Inhibitors im Blut kann im Falle der ausge-

wählten Beispiele (Pro-Pro-Ile-Thia = PPIThia, Gly-Pro-Ile-Thia = GPIThia) durch DP IV selbst bzw. durch Aminopeptidasen (pGlu-Ile-Thia = pEIThia, Pro-Ile-Thia = PIThia) erfolgen (Abbildung 1). Die Freisetzung des DP IV-Inhibitors Isoleucyl Thiazolidid aus den Prodrug-Verbindungen erfolgt im Blut bei gleicher eingesetzter Konzentration der Prodrugverbindung mit differenzierter Effizienz, wobei sich für Pro-Pro-Ile-Thia (PPI Thia) und pGlu-Ile-Thia (pEI Thia) eine im Vergleich zu Pro-Ile-Thia (PI Thia) und Gly-Pro-Ile-Thia (GPI thia) stärker retardierte Wirkstoff-Freisetzung zeigt.

3. Verstärkung der über DP IV-Inhibitoren vermittelten Glukosetoleranz durch den Einsatz von Prodrugs

Durch Überführung des aktiven Wirkstoffes Isoleucyl Thiazolidid in erfindungsgemäße Prodrugs beobachtet man nach oraler Applikation bei der Wistar-Ratte ein deutlich verbessertes Wirkprofil (Abbildung 2). Die erwünschte Reduktion des Blutglukosespiegels durch DP IV-Inhibitoren im untersuchten Zeitintervall wird durch Einsatz der Prodrug-Verbindugen erfindungsgemäß gegenüber dem unmaskierten Wirkstoff Ile-Thia etwa um 30 % verstärkt (Tabelle 4):

Tabelle 4: Abhängigkeit des Blutglukosespiegels innerhalb von 100 Minuten nach p.o. Glukosestimulierung und p.o. Verabreichung von Ile-Thia bzw. erfindungsgemäßen Prodrugs an Wistar-Ratten (Dosis: 2,5  $\mu$ M Wirkstoff/300 g Tier)

Wirkstoff / Prodrug	% Glukosespiegel	
Kontrolle	100	
lle-Thia	74,4	
Gly-Pro-Ile-Thia	57,1	
Pro-Ile-Thia	56,1	

### Patentansprüche

1. Prodrug-Verbindungen von Inhibitoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV), welche Prodrug-Verbindungen die allgemeine Formel A-B-C aufweisen, wobei

### A eine Aminosäure

- B die chemische Bindung zwischen A und C oder eine Aminosäure, und
- C ein stabiler Inhibitor von DP IV ist.
- 2. Prodrug-Verbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin, Hydroxyprolin, Thiazolidincarbonsäure, Dehydroprolin, Pipecolinsäure, Azetidincarbonsäure oder Aziridincarbonsäure ist.
- 3. Prodrug-Verbindungen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß B Prolin, Hydroxyprolin ist.
- 4. Prodrug-Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß C ein Aminoacylpyrrolidid, Aminoacylthiazolidid oder N-Dipeptidyl, O-Acyl Hydroxylamin ist.
- 5. Prodrug-Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren in Salzform vorliegen.
- 6. Prodrug-Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß A-B ein Dipeptid der Formel Ile-Pro oder Gly-Pro ist.

- 7. Pharmazeutische Zusammensetzung insbesondere zur oralen Verabreichung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Prodrug-Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägern oder Hilfsstoffen enthält.
- 8. Verwendung von Prodrug-Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur zeitlich gesteuerten in vivo Inhibierung von DP IV.
- 9. Verwendung von Prodrug-Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur zell-, gewebs- oder organspezifischen Inhibierung von DP IV.
- 10. Verwendung von Prodrug-Verbindungen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Behandlung von Erkrankungen von Säugern, die durch Modulation der DP IV-Aktivität eines Säugers behandelt werden können.
- 11. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen von Menschen.
- 12. Verwendung nach Anspruch 9 zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.

Abbildung 1: Inhibierung der DP IV in humanem Vollblut durch Freisetzung des DP IV-Inhibiotors Ile-Thia aus erfindungsgemäßen Prodrugs

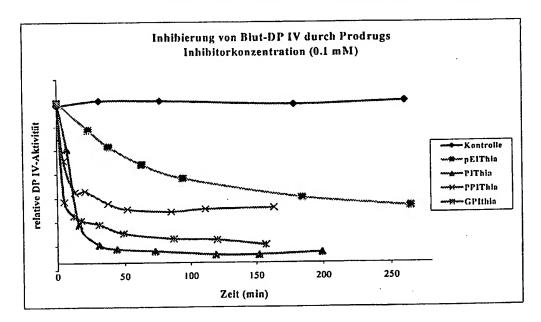
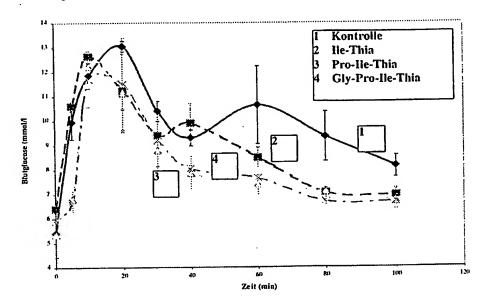


Abbildung 2: Glukosespiegel in Serum nach oraler Glukosestimulierung und p.o. Prodrug-Gabe an die Wistarratte



Inter tional Application No PCI/EP 99/04382

A CLASSIE	ICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 6	C07k5/078 C07k5/083 C	07K5/097	A61K38/05	A61K38/06
According to	International Patent Classification (IPC) or to both nati	onal classification a	nd IPC	
B. FIELDS				
Minimum do	cumentation searched (classification system followed to CO7K A61K	by classification sym	bols)	
.1100	567K 7.52K			
Documentati	on searched other than minimum documentation to the	extent that such do	cuments are included in	the fields searched
Documentati	on behavior of the training desired and the sa			
				torms (mod)
Electronic da	ata base consulted during the international search (na	me of cata base and	, where practical, search	terms used)
C. DOCUME	NTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropr	iate, of the relevant p	sesages	Relevant to claim No.
Х	WO 98 22494 A (SCOTT WILL) :THORSETT EUGENE D (US); /			1,4
	(US);) 28 May 1998 (1998-		· C	
	claims; example 344	20 20,		
				1 4 7 11
X	WO 95 29691 A (GEORGIA TECH RES INST) 9 November 1995 (1995-11-09)		1,4,7-11	
	page 3, line 9 - line 25	<i>09)</i>		
,	page 13, line 30 -page 14	, line 7		
			IED.	1 10
A	DE 196 16 486 A (HANS KNO NATURSTO) 30 October 1997			1-12
	the whole document	(1997 10 5		
	Start Sign Later Start Start			
ļ				
		,		
Furt	her documents are listed in the continuation of box C.	X	Patent family member	ors are listed in annex.
* Special ca	tegories of cited documents:			. A A
1	ant defining the general state of the art which is not		or priority date and not in	after the international filing date conflict with the application but rinciple or theory underlying the
consid	tered to be of particular relevance		invention	
filing o			cannot be considered no	evance; the claimed invention vel or cannot be considered to
which	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another			when the document is taken alone evance; the claimed invention
	n or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or		document is combined w	involve an inventive step when the ith one or more other such docu-
	means ent published prior to the international filing date but		ments, such combination in the art.	being obvious to a person skilled
later t	han the priority date claimed		locument member of the	
Date of the	actual completion of the international search		Date of mailing of the inte	rnational search report
5	October 1999		12/10/1999	
	mailing address of the ISA	-	Authorized officer	1
Manue aug	European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2			
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fay: (+34-70) 340-3016		Fuhr, C	

International application No.

# PCT/EP 99/04382

Box I	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This inter	mational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. <b>X</b>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Observation: Although Claims Nos. 9-12 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. <b>X</b>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
	See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210
3.	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This Inte	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remai	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No. PCT/EP 99/04382

In view of the wording of the present patent claims which makes it more difficult if not altogether impossible to determine the scope for which protection is sought, the present patent application does not, to a certain extent, comply with the requirements of PCT Article 6 (cf. also PCT Rule 6.1(a)) thus making a meaningful search unfeasible. The concept 'unstable inhibitor' is especially unclear. This concept is not defined in the description even though the difference between stabile and unstable inhibitors appears to be expressly required under the terms of the application (for example over the plasma half life).

For this reason, the search was directed at the sections of the patent claims which appear to be supported and disclosed in the above-mentioned sense, namely at the sections pertaining to the compounds as cited in the examples i.e. including closely related homogeneous compounds.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

information on patent family members

Inter Vonal Application No PC1/EP 99/04382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822494 A	28-05-1998	AU 5356198 A EP 0942924 A HR 970627 A NO 992368 A	10-06-1998 22-09-1999 31-08-1998 21-06-1999
WO 9529691 A	A 09-11-1995	US 5543396 A	06-08-1996
DE 19616486 A	A 30-10-1997	AU 3023397 A CA 2252576 A CN 1216468 A WO 9740832 A EP 0896538 A	19-11-1997 06-11-1997 12-05-1999 06-11-1997 17-02-1999

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

onales Aktenzeichen PCT/EP 99/04382

A. KLASSII IPK 6	Fizierung des anmeldungsgegenstandes C07K5/078 C07K5/083 C07K5/093	7 A61K38/05 A61K3	8/06
	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	aifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol	A)	
IPK 6	CO7K A61K	• ,	
Recherchier	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	veit diese unter die recherchierten Gebiete f	fallen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank und evtl. verwendete S	iuchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 22494 A (SCOTT WILLIAM LEON; THORSETT EUGENE D (US); AUDIA JA (US);) 28. Mai 1998 (1998-05-28) Ansprüche; Beispiel 344		1,4
X	WO 95 29691 A (GEORGIA TECH RES I 9. November 1995 (1995-11-09) Seite 3, Zeile 9 - Zeile 25 Seite 13, Zeile 30 -Seite 14, Zei		1,4,7-11
A	DE 196 16 486 A (HANS KNOELL INST NATURSTO) 30. Oktober 1997 (1997- das ganze Dokument 		1-12
	itere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu nehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
"Besonder "A" Veröffe aber i "E" älteres Anme "L" Veröffe schei ander soll oo ausge "O" Veröffe eine E "P" Veröffe dem i	re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen sidedatum veröffentlicht worden ist entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Rechercherbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie aführt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht Anmeldung nicht kollidiert, sondern nut Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentlichtung von besonderer Bedeu kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betra "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann nicht als auf erfinderischer Tätigk werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitgiled derselben Absendedatum des internationalen Re	worden ist und mit der r zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden utung; die beanspruchte Erfindung chung nicht als neu oder auf utung; die beanspruchte Erfindung teit beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist n Patentfamilie iet
9	5. Oktober 1999	12/10/1999	
Name und	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340–3016	Bevolimächtigter Bediensteter Fuhr, C	

1

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04382

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:  1. X Ansprüche Nr.
1. X Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9–12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. X Ansprüche Nr. — weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recher-chenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist In folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs  Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

### **WEITERE ANGABEN**

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Angesichts des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschwert wenn nicht gar unmöglich macht, den durch sie erstrebten Schutzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Besonders unklar ist hierbei der Begriff 'stabiler Inhibitor'. Dieser Begriff wird in der Beschreibung nicht definiert, obwohl die Abgrenzung von stabilen und instabilen Inhibitoren im Sinne der Anmeldung (beispielsweise über die Plasmahalbwertszeit) dringend erforderlich erscheint Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Verbindungen, wie sie in den Ausführungsbeispielen angegeben sind, einschliesslich nahverwandter homogener Verbindungen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichur. \_ -n, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter nales Aktenzeichen
PCT/EP 99/04382

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9822494	A	28-05-1998	AU EP HR NO	5356198 A 0942924 A 970627 A 992368 A	10-06-1998 22-09-1999 31-08-1998 21-06-1999
WO 9529691	Α	09-11-1995	US	5543396 A	06-08-1996
DE 19616486	A	30-10-1997	AU CA CN WO EP	3023397 A 2252576 A 1216468 A 9740832 A 0896538 A	19-11-1997 06-11-1997 12-05-1999 06-11-1997 17-02-1999